产对香豆酸酿酒酵母菌株的构建及优化*

Construction and Optimization of p-coumaric acid Producing *Saccharomyces cerevisiae*

张伟[1,2]，刘夺[1,2]，李炳志[1,2**]，元英进[1,2]

（1 天津大学化工学院制药工程系 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300072）

（2 天津化学化工协同创新中心合成生物学平台 天津 300072）

ZHANG Wei[1,2], LIU Duo[1,2], LI Bing-zhi[1,2], YUAN Ying-jin[1,2]

（1 Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University; Key Laboratory of System Bioengineering (Ministry of Education), Tianjin 300072, China）

（2 SynBio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China）

摘要 对香豆酸（p-coumaric acid）作为苯丙素类物质、芪类物质以及黄酮类物质的重要前体化合物，在生物医药、化妆品以及食品工业中均有广泛的应用价值。以酿酒酵母作为底盘菌株，利用合成生物学原理构建一株高产对香豆酸的人工酵母细胞。通过对比不同拷贝数的酪氨酸解氨酶（Tyrosine ammonia lyase）合成的对香豆酸产量，发现随着基因拷贝数的增加对香豆酸的产量也相应提高；同时对酪氨酸的负反馈调控相关的蛋白进行氨基酸定点突变得到 Aro4p^{K229L} 和 Aro7p^{G141S}，利用 *delta* 位点将突变后的基因整合至酵母基因组，并挑取 24 株构建成功的酵母细胞进行发酵验证，发现菌株最高产量与最低产量相差 28.87 mg/L；为了进一步增加对香豆酸的代谢通量，本研究对生成芳香醇类物质的旁路基因 *ARO10* 和 *PDC5* 进行敲除，发现同时敲除两个基因的菌株对香豆酸的产量最高，是敲除前产量的 2.05 倍（从 42.71 mg/L 到 87.56 mg/L）；此外，通过设计前体酪氨酸的梯度添加实验，发现当添加 1 mM 的酪氨酸时，对香豆酸产量达到峰值 174.57±0.30 mg/L，相较于未添加时提高了将近一倍。本研究通过运用合成生物学原理在酿酒酵母中实现了对香豆酸的高产，为后续的芪类化合物和黄酮类化合物生物合成奠定了基础。

关键词 合成生物学 对香豆酸 酿酒酵母 内源改造

*基金项目：国家自然科学基金（21576198 和 21622605）、天津市科技计划项目（13RCGFSY19800）

**通讯作者，电子邮箱：bzli@tju.edu.cn

Abstract P-coumaric acid is widely used in bio-pharmaceutical, cosmetics and food industry as a very important precursor compound of phenylpropanoids, stilbenes and flavonoids. *Saccharomyces cerevisiae* was used as the host cell to synthesize p-coumaric acid with the methods of synthetic biology. It was demonstrated that the multi-copies plasmid harbored *TAL* showed a larger accumulation of p-coumaric acid; meanwhile, to eliminate the feedback inhibition of L-tyrosine, specific amino acid mutation Aro4p^{K229L} and Aro7p^{G141S} was obtained. The relevant mutated gene was integrated into yeast genome using delta site integration. 24 strains were picked out to verify the production of p-coumaric acid, the different yield between the highest strain and the lowest strain was 28.87 mg/L. To strength the metabolic flux to p-coumaric, gene *ARO10* and *PDC5* which involved in the biosynthesis of byproduct aromatic alcohols were knocked out. Production of p-coumaric acid in strain with two gene knock out was improved to 87.56 mg/L, 2.05-fold to the control one. Furthermore, when 1 mM L-tyrosine was added, the production of p-coumaric acid arrived the peak, about 174.57±0.30 mg/L. This work has successfully constructed the p-coumaric acid over-producing *S. cerevisiae* using the synthetic biology method as well as lay a foundation of the biosynthesis of subsequent stilbenes and flavonoids.

Key words synthetic biology p-coumaric acid *Saccharomyces cerevisiae* endogenous modifications

引言

对香豆酸（p-coumaric acid），即对羟基肉桂酸，广泛存在于自然界植物中，尤其是白花蛇舌草、海金沙草、杜仲叶等中草药中[1]。对香豆酸在预防心血管、抗癌、抗氧化、抗炎等方面均发挥着重要的作用[2,3,4]，同时也在糖尿病和高血脂等病症上有着潜在治疗活性[5]。此外，对香豆酸作为一种芳香类氨基酸，也是很多植物次级代谢产物的前体物质，如柚皮素、白藜芦醇、花青素、儿茶素等黄酮类、芪类高附加值的天然产物[6,7,8,9]。目前，对香豆酸的主要来源为植物提取、化学合成和生物合成。植物提取面临生长周期长，收益率低以及受环境影响大等问题，而化学合成则面临高能耗，低产率以及污染环境等问题，生物合成因其具有低成本、高产率和绿色环保等优点被认为是二十一世纪最有前途的生产方法。

目前对香豆酸的生物合成法一种是通过苯丙氨酸（phenylalanine，Phe）在苯

丙氨酸脱氨酶（Phenylalnine ammonialyase）4-肉桂酸羟化酶（Cinnamate 4-hydroxylase）的作用下转化为对香豆酸，但由于4-肉桂酸羟化酶是一种细胞色素P450氧化酶，在微生物中的表达有一定的难度，导致转化率较低，因此4-肉桂酸羟化酶被认为是对香豆酸生产的限速酶[10,11]；相比于前者，以酪氨酸为底物进行反应，仅需要经过酪氨酸解氨酶（Tyrosine ammonia lyase）的作用便可将酪氨酸转化为对香豆酸，反应路径更短，转化效率更高，因此研究者们通常采取这条路径进行对香豆酸的合成[12,13,14]。 Xue 等[15]将粘红酵母源（*Rhodotorula glutinis*）的 *TAL* 基因导入到大肠杆菌中实现了从酪氨酸到对香豆酸的转化。Li 等[16]通过在酿酒酵母中过表达半叶趾虎橙黄扶桑源（*Hemiphyllodactylus aurantiacus*）和约氏黄杆菌源（*Flavobacterium johnsoniae*）的 *TAL* 基因，并额外添加 5 mM 的酪氨酸分别得到了 7.04 mg/L 和 13.71 mg/L 的对香豆酸。

在底盘细胞的选择上，大肠杆菌由于其自身的内毒素导致其在医药和食品的工业生产上有一定的局限性，而酿酒酵母则被认为是安全的模式微生物工程菌株。酿酒酵母的遗传背景清楚且易于进行基因改造，在天然产物的生产上被广泛应用[17]。本研究以酿酒酵母 BY4741 为底盘菌株，引入圆红冬孢酵母源（*Rhodosporidium toruloides*）的 *TAL* 基因[18]，并通过质粒拷贝数的不同对此基因的表达强度进行调节，在此基础上利用工程学思想对酿酒酵母内源上游路径进行改造[19,20]使其高产对香豆酸，通过 *delta* 位点整合[21,22]来过表达酪氨酸的反馈抑制调节的相关基因 *ARO4* 及 *ARO7* 相应的特定位点突变体 *ARO4**和 *ARO7**（带*代表突变后的基因）来解除对关键酶的抑制作用[23]；同时对旁路副产物路径的基因进行敲除（图 1），从而避免芳香醇类物质的合成进而使合成芳香氨基酸代谢通量增大，以提高对香豆酸的产量；后期探索了前体酪氨酸的外源添加对对香豆酸产量的影响，为在酿酒酵母中生物合成对香豆酸和后续的苯丙烷类物质和黄酮类物质提供参考依据。

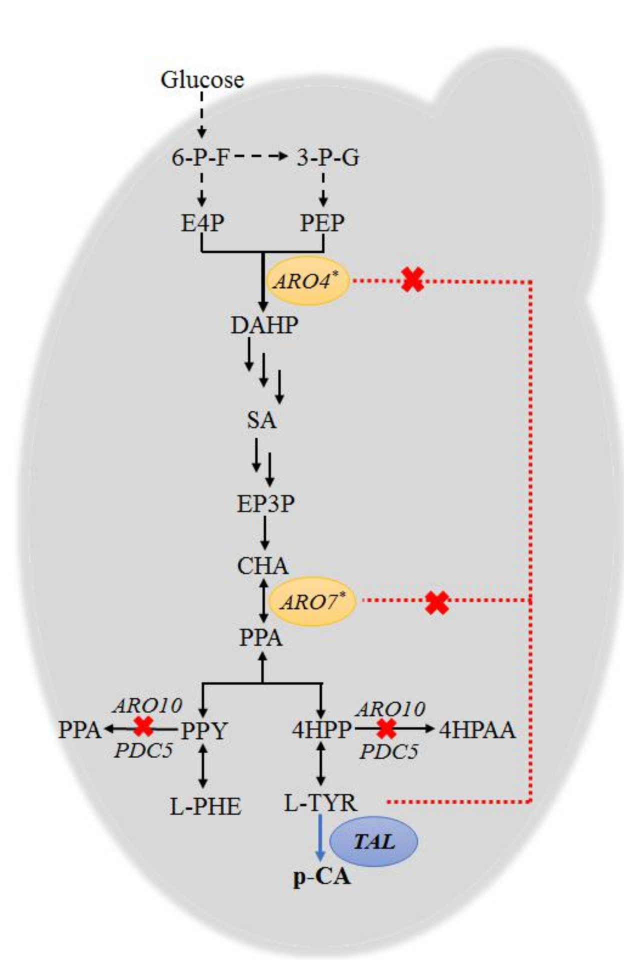


图 1 酿酒酵母菌中对香豆酸的生物合成路径及改造策略

Fig.1 Biosynthesis pathway and modified strategies of p-coumaric acid in *S. cerevisiae*

1 实验材料和方法

1.1 工具酶及试剂

T4 DNA 连接酶、Q5 超保真 DNA 聚合酶和限制性内切酶 *Bsa* I-HF、*Not* I-HF 购自 NEB（New England Biolab）公司；质粒小提试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根公司；对香豆酸标准品（CAS 号：501-98-4）购自上海源叶生物科技有限公司；PEG3350、鲑鱼精 DNA、各类氨基酸粉末购自鼎国昌盛公司；去氨基酵母氮源（YNB）购自于 GENVIEW 公司；醋酸锂购自北方天医化学试剂厂；G418 抗生素购自于 GENVIEW 公司；甲醇购自与 Fisher 公司，甲酸（Formic acid）购自于 DikmaPure 公司；大肠杆菌感受态细胞 DH5α购自 Biomed 公司。

1.2 菌株、质粒和培养基

本文涉及的所有质粒和菌株信息详见表 1 和表 2。酿酒酵母菌株 BY4741[24]

（*MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0*），酵母表达载体 pRS416 为本实验室保存，pRS425K 为本实验室构建。

LB 培养基（10 g/L 氯化钠；10 g/L 胰蛋白胨；5 g/L 酵母提取物；固体培养基添加 20 g/L 琼脂粉）用于大肠杆菌培养；YPD 培养基（20 g/L 葡萄糖；20 g/L 胰蛋白胨；10 g/L 酵母提取物；固体培养基添加 20 g/L 琼脂粉）用于酿酒酵母培养；SC 培养基（20 g/L 葡萄糖；6.7 g/L 去氨基酵母氮源；2 g/L 缺亮氨酸、组氨酸、尿嘧啶的混合氨基酸粉末；固体培养基添加 20 g/L 琼脂粉）用于酵母转化子的筛选、培养和发酵；G418 固体培养基（20 g/L 葡萄糖；6.7 g/L 去氨基酵母氮源；2 g/L 缺亮氨酸、组氨酸、尿嘧啶的混合氨基酸粉末；200 μg/mL G418 抗生素；20 g/L 琼脂粉）用于基因的敲除；YPG 培养基（20 g/L 半乳糖；20 g/L 胰蛋白胨；10 g/L 酵母提取物）用于诱导 *Cre* 酶的表达。

表 1 实验中涉及的质粒

Table 1 Plasmids used in this research

Plasmids	Description	Source
pRS416	single copy plasmid with *URA3* and *Amp*^{r} marker	Purchased
pRS425K	replace *AmpKX* with *KanMX* in pRS425	This lab
Module 1	pRS425K: T_{CYC1}-P_{TDH3}-T_{TEF1}	This study
Module 2	pRS425K: T_{CYC1}-P_{TDH3}-*TAL*-T_{TEF1}	This study
Module 3	pRS416: T_{CYC1}-P_{TDH3}-*TAL*-T_{TEF1}	This study
Module 4	pRS425K: *delta1*-*URA3*-T_{GPD}	This study
Module 5	pRS425K: T_{GPD}-P_{PGI1}-T_{FBA1}	This study
Module 6	pRS425K: T_{GPD}-P_{PGI1}-*ARO4**-T_{FBA1}	This study
Module 7	pRS425K: T_{FBA1}-P_{TPI1}-T_{PGK1}	This study
Module 8	pRS425K: T_{FBA1}-P_{TPI1}-*ARO7**-T_{PGK1}	This study
Module 9	pRS425K: T_{PGK1}-*delta2*	This study
Module 10	pEASY-Blunt-L-arm1-*KANMX4*-R-arm1	This study
Module 11	pEASY-Blunt-L-arm2-*KANMX4*-R-arm2	This study
Module12	pRS413: P_{GAL1}-*Cre*-T_{CYC1}	This study

表 2 实验中涉及的酵母菌株

Table 2 Yeast strains involved in this study

Strains	Description	Source
BY4741	*MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0*	Purchased
SyBE_Sc02120000	BY4741, Module 3	This study
SyBE_Sc02120001	BY4741, Module 2	This study
SyBE_Sc02120002	BY4741, *Delta::URA3*_ T_{GPD}-P_{PGI1}-*ARO4**-T_{FBA1}-P_{TPI1}-*ARO7**-T_{PGK1}	This study
SyBE_Sc02120003	SyBE_Sc02120002, Module 2	This study
SyBE_Sc02120004	SyBE_Sc02120002, *ΔARO10*	This study

SyBE_Sc02120005	SyBE_Sc02120004, Module 2	This study
SyBE_Sc02120006	SyBE_Sc02120002, *ΔPDC5*	This study
SyBE_Sc02120007	SyBE_Sc02120006, Module 2	This study
SyBE_Sc02120008	SyBE_Sc02120002, *ΔARO10, ΔPDC5*	This study
SyBE_Sc02120009	SyBE_Sc02120008, Module 2	This study

1.3 酿酒酵母表达载体、整合质粒载体和敲除质粒载体的构建

基因表达载体、过表达基因模块和敲除模块的构建如图 2 所示。以 BY4741 基因组 DNA 为模板，通过特异性引物 PCR 扩增 CYC1、TEF1、GPD、FBA1、PGK1 终止子，TDH3、PGI1、TPI1 启动子，L-arm1（*ARO10* 基因起始密码子上游 398 bp），R-arm1（*ARO10* 基因终止密码子下游 409 bp），L-arm2（*PDC5* 基因起始密码子上游 441 bp），R-arm2（*PDC5* 基因终止密码子下游 450 bp）和 *URA3* ORF 框；通过引物设计氨基酸突变点，以 BY4741 基因组为模板 PCR 扩增 *ARO4** 和 *ARO7**两个具有定点氨基酸位点突变的基因；通过特异性引物，以含有 *loxP* 和 G418 基因的质粒为模板扩增基因敲除的标签。通过 OE-PCR（over-lap PCR）扩增得到 T_{CYC1}-P_{TDH3}-T_{TEF1} 片段并以 *Not* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module1；将 *TAL* 基因以 *Bsa* I 酶切到 Module1 中，命名为 Module2；将 T_{CYC1}-P_{TDH3}-*TAL*-T_{TEF1} 片段 *Not* I 酶切连入 pRS416 中，命名为 Module3；通过 OE-PCR 扩增得到 *delta1*-*URA3*-T_{GPD} 片段并以 *Not* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module4；相同的，通过 OE-PCR 扩增得到 T_{GPD}-P_{PGI1}-T_{FBA1} 片段并以 *Not* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module5；通过 OE-PCR 扩增得到 T_{FBA1}-P_{TPI1}-T_{PGK1} 片段并以 *Not* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module7；将 *ARO4**基因以 *Bsa* I 酶切到 Module5 中，命名为 Module6；将 *ARO7**基因以 *Bsa* I 酶切到 Module7 中，命名为 Module8；通过 OE-PCR 扩增得到 T_{PGK1}-*delta2* 片段并以 *Not* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module9；通过 OE-PCR 扩增得到 L-arm1-*KANMX4*-R-arm1 片段并以 *Not* I 酶切连接到 pEASY-Blunt，命名为 Module10；通过 OE-PCR 扩增得到 L-arm2-*KANMX4*-R-arm2 片段并以 *Not* I 酶切连接到 pEASY-Blunt，命名为 Module11。

酪氨酸解氨酶基因 *TAL* 来源于圆红冬孢酵母（*Rhodosporidium toruloides*），基因经过 *Jcat* 按照酿酒酵母密码子偏好性进行优化并规避常用酶切位点，并在两端添加 *Bsa* I 酶切位点后交由金斯瑞公司合成。合成回来的基因质粒用 *Bsa* I

酶切，获得基因片段，同时将相应质粒也用 *Bsa* I 酶切，纯化回收后经 T4 连接酶连接，得到相应的基因表达载体。

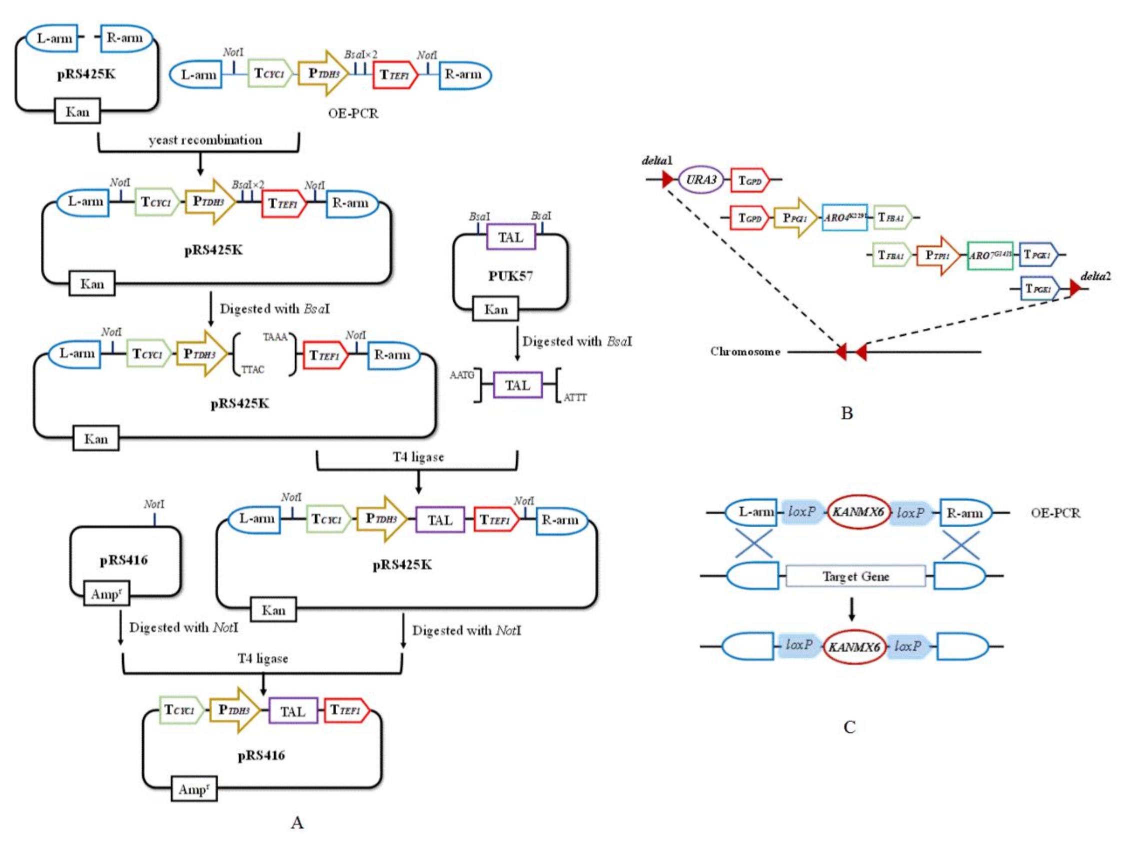


图 2 外源基因表达载体、基因过表达盒以及基因敲除盒的构建

Fig.2 Construction of heterogenous gene expression plasmid, gene overexpression and gene deletion cassette

1.4 人工酵母菌株的发酵

将得到的人工酿酒酵母菌株接种于 5 mL 种子培养基中，在 30℃、250 rpm 培养 11-13 h，以初始菌体浓度 OD_{600}=0.2 分别接种于 50 mL 二级种子培养基中，培养 8-12 h，以初始菌体浓度 OD_{600}=0.2 接种于 50 mL 发酵培养基中，于 30℃、250 rpm 条件下培养，以此条件继续培养至 96 h。

1.5 对香豆酸的提取和检测

取 500 μL 菌液于干净的 2 mL EP 管中，加入 500 μL 乙酸乙酯，置于振荡器中涡旋 10 min，12000 rpm 离心 5 min，取上层乙酸乙酯有机相于干净 2 mL EP 管中，再向余下的菌液中加入 500 μL 乙酸乙酯重复上述操作一次。将两次乙酸乙酯有机相抽提液（共 1 mL）氮吹浓缩，加入 500 μL 色谱纯甲醇溶解，并采用 0.2 μm 有机滤膜过滤，利用高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）检测对香豆酸浓度。色谱条件：色谱柱：BDS HYPERSIL

C18 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；检测器：Waters2489 UV/Vis；泵：Waters e2695；流动相：甲醇和 0.1%甲酸-水；柱温：30℃；流速：0.2 mL/min；进样体积：5 μL。对香豆酸检测波长为 310 nm。

2 结果与分析

2.1 生产对香豆酸酿酒酵母菌株的构建及表达水平的调节

酪氨酸解氨酶基因 *TAL* 经文献报道的来源有很多种[25]，本研究选取的是圆红冬孢酵母源[18]（*Rhodosporidium toruloides*），在对其进行酿酒酵母最适密码子优化之后，连入 pRS416 的单拷贝质粒（拷贝数为 1 个）中，即 Module3，并通过醋酸锂转化法[26]转化至酿酒酵母菌株 BY4741 中，摇瓶发酵后经 HPLC 检测产物，在保留时间为 7.50 min 时检测到对香豆酸（与标准品保留时间一致），产量约为 32.21 mg/L。异源合成产物的关键基因的拷贝数影响产物的产量[27]，为了提高 *TAL* 基因在胞内的表达量，本研究构建了将 *TAL* 连接至多拷贝质粒 pRS425K（拷贝数约为 20~50 个）的模块，即 Module2，转化至 BY4741 中后摇瓶发酵。实验结果表明，多拷贝与单拷贝质粒相比在对香豆酸产量上提高了约 23%，说明通过增加基因拷贝数来提高酪氨酸解氨酶在胞内的表达量，进而提高对香豆酸的产量的策略具有可行性。

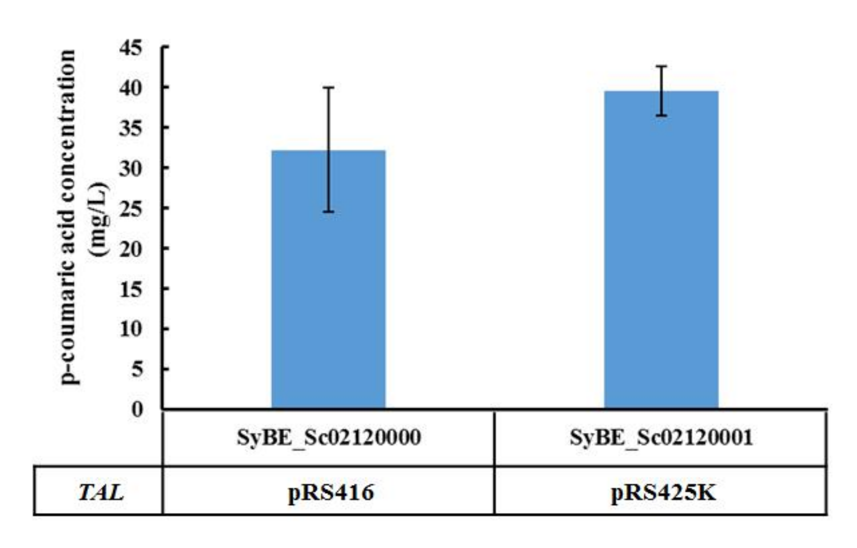


图 3 *TAL* 基因在不同的表达水平对产物产量的影响

Fig.3 Effects of *TAL* in different expression levels on production of p-coumaric acid

2.2 负反馈抑制相关基因的过表达

目前的研究表明，在酿酒酵母的酪氨酸生物合成路径中涉及到两步有关反馈抑制的反应，第一个反应是编码 DAHP

（3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate）合成酶的 *ARO4* 基因，为酪氨酸的反馈抑制基因。将 *ARO4* 的 229 位的赖氨酸突变为亮氨酸后，此基因便不再受酪氨酸的反馈抑制作用[28]；由 *ARO7* 编码的分支酸变位酶（Chorismate mutase）则被认为是第二个受酪氨酸反馈抑制的酶，但将 141 位的丝氨酸变为甘氨酸之后，酪氨酸对其的反馈抑制也被解除[29]。Li 等[16]通过过表达 $ARO4^{K229L}$、$ARO7^{G141S}$ 以及白藜芦醇生物合成路径上的基因获得的白藜芦醇产量为对照菌株 36 倍。本研究通过 OE-PCR 将受酪氨酸反馈抑制酶的相应基因进行定点氨基酸突变（将成功克隆的片段进行测序验证），在酿酒酵母中以 *delta* 位点整合[30,31]至基因组的方式实现基因的稳定存在。用 *Not* I 切下 Module4、Module6、Module8、Module9，将 4 个片段共转化至酿酒酵母菌株 BY4741，提取酵母基因组进行 PCR 验证，出现条带大小正确的目标条带，从而确定阳性克隆，对整合完成后正确的转化子导入 Module2 对产物通过高效液相色谱法进行筛选验证。由图 4 可知，采用 *delta* 位点进行基因整合时，不同菌株之间对香豆酸的产量有较为明显的差异。其中菌株 SyBE_Sc02120002-5 的对香豆酸产量最高，为 41.93 mg/L，菌株 SyBE_Sc02120002-9 的产量最低为 13.06 mg/L，差异达到 3 倍，其余菌株的对香豆酸产量呈正态分布。*Delta* 位点整合产生的不同菌株之间的差异，可能是由于整合位置和数目引起的，这在 Wang 等人[32]在合成β-胡萝卜素菌株的构建中也有所体现。将对香豆酸产量最高的菌株命名为 SyBE_Sc02120002。与未过表达突变基因的菌株相比，对香豆酸产量也有一定的提升。

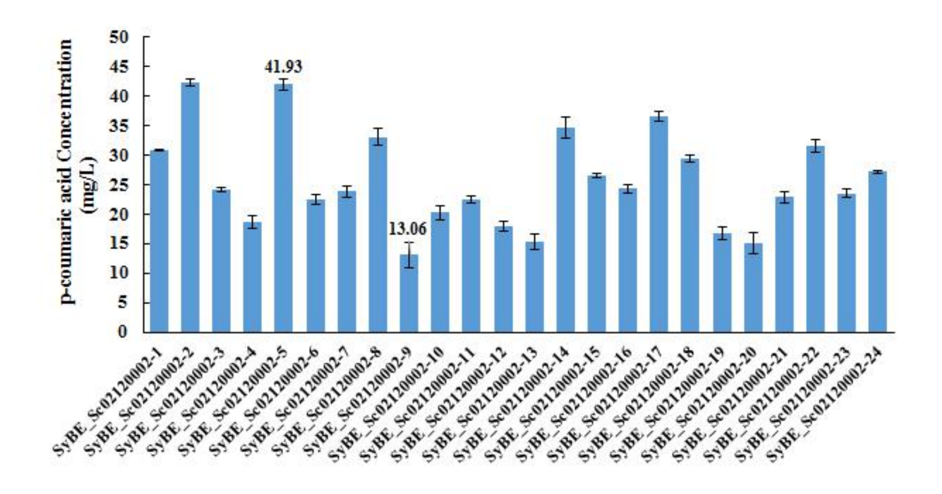


图 4 *Delta* 位点整合过表达基因人工酿酒酵母菌株的筛选

Fig.4 Screening of engineered *S. cerevisiae* of gene overexpression by *delta* site integration

2.3 竞争路径基因的敲除

丙苯酮酸（PPY）和 4-羟基苯丙酮酸（4-HPP）是生物合成酪氨酸途径上重要的前体物质（图 1）。PPY 和 4-HPP 在 *ARO10* 和 *PDC5* 基因编码的酶的作用下，分别生成旁路物质苯乙醛和 4-羟基乙酸[33]。本研究从阻断旁路物质合成的角度出发，实现苯丙酮酸和 4-羟基苯丙酮酸的积累，从而为生物合成对香豆酸提供更多的前体。

以 SyBE_Sc02120002 为底盘菌株，分别构建单基因敲除 *ARO10*、*PDC5* 以及双基因敲除 *ARO10* 和 *PDC5* 的菌株。将 Module10、Module11 用 *Not* I 切下 L-arm1-*loxP*-*KANMX4*- *loxP*-R-arm1 和 L-arm2-*loxP*-*KANMX4*- *loxP*-R-arm2 片段，采用醋酸锂转化法转化至酿酒酵母菌株 SyBE_Sc02120002 中，将得到的转化子进行划线分纯培养后提取酵母基因组进行四组特异性引物 PCR 验证，并将 PCR 得到的正确条带琼脂糖凝胶回收送至金唯智公司测序，得到完全匹配的测序结果则可确定相应基因已被敲除，将正确敲除基因的酵母菌株命名为 SyBE_Sc02120004 和 SyBE_Sc02120006。后向敲除基因的菌株内通过醋酸锂转化法导入 Module12，将正确的克隆接种到 YPG 培养基中，在半乳糖存在的条件下诱导 *Cre* 酶的表达[34]，从而使 *KANMX4* 标签两端的同向的 *loxP* 位点重叠，回收 G418 标签，再通过三组特异性引物 PCR 验证 *KANMX4* 基因已被敲除。将已收回 G418 标签的菌株在 YPD 中传代丢失质粒 Module12。在此菌株上继续进行另一个基因的敲除，得到酿酒酵母菌株 SyBE_Sc02120008。通过导入 Module2 来验证基因敲除对对香豆酸产量的影响。

由图 5 的发酵结果可知，单独敲除 *ARO10* 或 *PDC5* 基因时均可以提高对香豆酸的产量，且单独敲除两个基因对产量的影响无明显差异，与对照菌株相比，对香豆酸产量提高了 87%。当两个基因均被敲除之后，相较于单敲菌株对香豆酸的产量有所提高，在阻断旁路物质的合成之后，使向合成对香豆酸的代谢通量增大，进而产量得到了提高。菌株 SyBE_Sc02120009 的对香豆酸产量为 87.56 mg/L，是对照菌株的 2.05 倍。Rodriguez 等人[35]以 CEN.PK 为底盘菌株在单独敲除 *ARO10* 或 *PDC5* 时，得到的对香豆酸的产量仅比对照菌株提高了 25%，但双敲除菌株的产量为对照菌株的 2.29 倍左右。由此可见，选取不同的酿酒酵母菌株作为底盘时，在改造的过程产量和终产量上也会有一定的差异，同样的结果在

Zhang[36]的大肠杆菌的工作中也有所体现。

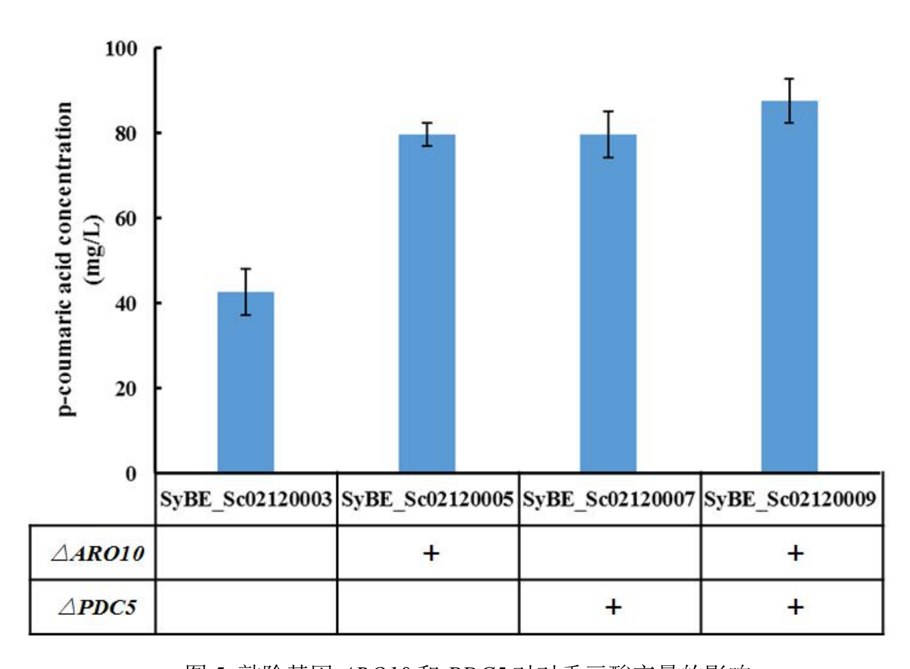


图 5　敲除基因 *ARO10* 和 *PDC5* 对对香豆酸产量的影响

Fig.5 Effects of *ARO10* and *PDC5* knock out on production of p-coumaric acid

2.4 外源添加 L-酪氨酸对对香豆酸产量的影响

目前利用微生物异源生产苯丙素类、黄酮类化合物时，往往采取外源添加前体物质的策略[37,38]。在对香豆酸的生物合成上，一般采用添加 L-酪氨酸来提高产量。Wang 等[39]通过外源添加 3 mM 的酪氨酸在大肠杆菌中合成了 160.5 mg/L 的对香豆酸，Santos 等人[40]也通过向培养基中添加 500 mg/L 的酪氨酸并以不同的大肠杆菌作为宿主细胞分别得到了 104 mg/L 和 213 mg/L 的对香豆酸。在酿酒酵母中也同样采取外源添加的方式，Shin 等[41]通过添加 12 mM 酪氨酸得到 13.6 mg/L 对香豆酸。本研究在人工酿酒酵母 SyBE_Sc02120009 的基础上，设计外源添加前体酪氨酸的实验，来考察不同浓度的前体氨基酸的添加对对香豆酸产量的影响。本研究先验证 L-酪氨酸能否穿过酵母细胞壁到达胞内参与反应，实验结果证明可以实现，继而本研究选取了 0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM、1 mM 和 1.25 mM 五个浓度梯度，并以未添加酪氨酸的作为对照，发酵结束后测定对香豆酸的产量。实验结果表明，在酪氨酸添加浓度小于 1 mM 时，对香豆酸的产量随着酪氨酸添加的浓度增大而增大，在浓度为 1 mM 达到峰值，为 174.57±0.30 mg/L，当酪氨酸浓度增大到 1.25 mM 时，对香豆酸的产量反而降低，这表明外源添加

酪氨酸虽然能提高对香豆酸的产量，但高浓度的酪氨酸可能由于其抑制细胞生长或其他原因导致对香豆酸产量下降。所以，最终确定酪氨酸的添加量为 1 mM。

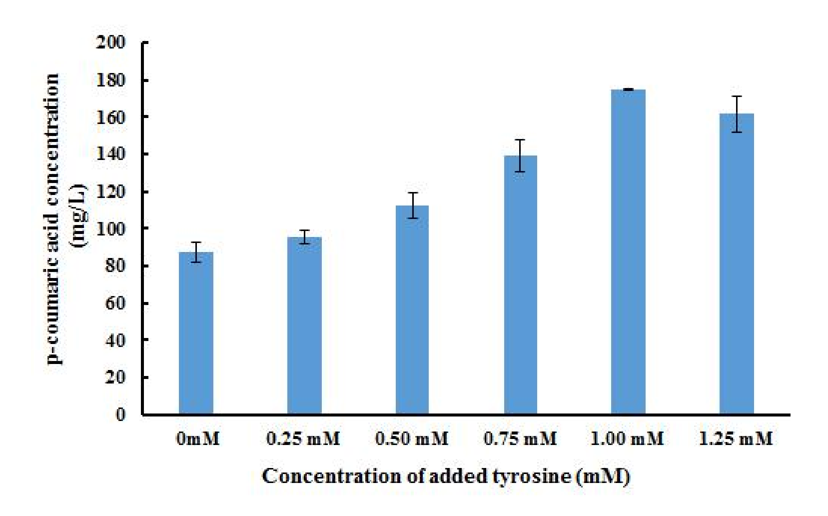


图 6 外源添加 L-酪氨酸对发酵产物对香豆酸产量的影响

Fig.6 Effects of added L-tyrosine concentration on production of p-coumaric acid

3 小结

本研究通过引入外源基因 *TAL* 实现了异源合成对香豆酸，并对 *TAL* 进行不同表达水平的调节；在此基础上，对酿酒酵母内源路径进行改造优化，其中包括对 L-酪氨酸的负反馈抑制基因进行氨基酸突变，并采用 *delta* 位点整合至酵母基因组，既增加了基因拷贝数同时也避免了多拷贝质粒容易丢失的问题，由于 *delta* 位点整合由于其整合位置和数目的不确定性本研究对构建成功的菌株进行筛选；其次，本研究也对合成对香豆酸的旁路路径进行相关基因的敲除工作，促进代谢流更多地流向对香豆酸，从而实现了在酿酒酵母中高产对香豆酸；另外，本研究也对 L-酪氨酸的外源添加对产物的影响做了探究，为生物合成对香豆酸及其衍生物打下基础。

参考文献

[1] 冉桂梅，何彬，杨凌,等．对香豆酸在大鼠体内的药动学研究．中国药学杂志, 2005, 40(24):1889-1891.

Ran G M, He B, Yang L, et al. Study on pharmacokinetics of p-coumaric acid in rat. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005, 40(24):1889-1891.

[2] Cheng J C, Dai F, Zhou B, et al. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. Food Chemistry, 2007, 104(1):132-139.

[3] Abdelwahab M H, Elmahdy M A, Abdellah M F, et al. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. Pharmacological Research, 2003, 48(5):461-465.

[4] Bodini S F, Manfredini S, Epp M, et al. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49(5):551-555.

[5] Alam M A, Subhan N, Hossain H, et al. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. Nutrition & Metabolism, 2016, 13(1):1-13.

[6] Fowler Z L, Koffas M A. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(5):799-808.

[7] Shin S Y, Jung S M, Kim M D, et al. Production of resveratrol from tyrosine in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme & Microbial Technology, 2012, 51(4):211-6.

[8] Yan Y, Chemler J, Huang L, et al. Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis in *Escherichia coli*. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(7):3617-23.

[9] Zhao S, Jones J A, Lachance D M, *et al*. Improvement of catechin production in *Escherichia coli* through combinatorial metabolic engineering. Metabolic Engineering, 2015, 28:43-53.

[10] Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic Engineering, 2009, 11(6):355-66.

[11] Yan Y, Kohli A, Koffas M A. Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(9):5610-3.

[12] Hwang E I, Kaneko M, Ohnishi Y, et al. Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. Applied & Environmental Microbiology, 2003, 69(5):2699-706.

[13] Vannelli T, Wei Q W, Sweigard J, et al. Production of p-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi. Metabolic Engineering, 2007, 9(2):142-151.

[14] Santos C N, Koffas M, Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. Metabolic Engineering, 2011, 13(4):392-400.

[15] Xue Z, Mccluskey M, Cantera K, et al. Improved production of p -hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme. Enzyme & Microbial Technology, 2007, 42(1):58-64.

[16] Li M, Kildegaard K R, Chen Y, et al. De novo production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic Engineering, 2015, 32:1-11.

[17] Siddiqui M S, Thodey K, Trenchard I, et al. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. Fems Yeast Research, 2012, 12(2):144.

[18] Liu D, Li B, Liu H, et al. Profiling influences of gene overexpression on heterologous resveratrol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Frontiers of Chemical Science & Engineering, 2016:1-9.
[19] Liu D, Jin D U, Zhao G, et al. Applications of synthetic biology in medicine and energy. Ciesc Journal, 2011, 62(9):2391-2397.
[20] 肖文海, 周嗣杰, 王颖,等. 如何工程化生物学. 化工进展, 2016, 35(6):1827-1836.
Xiao WH, Zhou SJ, Wang Y, et al. How to make biology more "engineering". Chemical industry and engineering progress, 2016, 35(6):1827-1836.
[21] Fink G, Farabaugh P, Roeder G, et al. Transposable elements (Ty) in yeast. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1981, 45 pt 2:575-580.
[22] Dujon B. The yeast genome project: what did we learn. Trends in Genetics, 1996, 12(7):263-270.
[23] Luttik M A, Vuralhan Z, Suir E, et al. Alleviation of feedback inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* aromatic amino acid biosynthesis: quantification of metabolic impact. Metabolic Engineering, 2008, 10(4):141-153.
[24] Brachmann C B, Davies A, Cost G J, et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. Yeast, 1998, 14(2):115–132.
[25] Jendresen C B, Stahlhut S G, Li M, et al. Novel highly active and specific tyrosine ammonia-lyases from diverse origins enable enhanced production of aromatic compounds in bacteria and yeast. Applied & Environmental Microbiology, 2015, 81(13):4458-76.
[26] Gietz R D, Schiestl R H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nature Protocols, 2007, 2(1):38-41.
[27] Ruizhao Wang, Xiaoli Gu, Mingdong Yao, et al. Engineering of β-carotene hydroxylase and ketolase for astaxanthin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. Frontiers of Chemical Science & Engineering, 2017.
[28] Hartmann M, Schneider T R, Pfeil A, et al. Evolution of feedback-inhibited beta /alpha barrel isoenzymes by gene duplication and a single mutation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(3):862-7.
[29] Krappmann S, Lipscomb W N, Braus G H. Coevolution of transcriptional and allosteric regulation at the chorismate metabolic branch point of *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(25):13585-90.
[30] † F W F L, Silva N A D. Sequential δ-Integration for the Regulated Insertion of Cloned Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Progress, 1997, 13(4):368–373.
[31] Sakai A, Shimizu Y, Hishinuma F. Integration of heterologous genes into the chromosome of Saccharomyces cerevisiae using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 33(3):302-306.
[32] 王瑞钊, 潘才惠, 王颖,等. 高产β-胡萝卜素酿酒酵母菌株的设计与构建. 中国生物工程杂志, 2016, 36(7):83-91.
Wang R Z, Pan C H, Wang Y, et al. Design and construction of highβ-carotene producing *Saccharomyces cerevisiae*. China Biotechnology, 2016, 36(7):83-91.
[33] Koopman F, Beekwilder J, Crimi B, et al. De novo production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1):155.
[34] Hegemann J H, Güldener U, Köhler G J. Gene disruption in the budding yeast

Saccharomyces cerevisiae. Methods in Molecular Biology, 2006, 313:129-144.

[35] Rodriguez A, Kildegaard K R, Li M, et al. Establishment of a yeast platform strain for production of p- coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis. Metabolic Engineering, 2015, 31:181-188.

[36] Zhang H, Stephanopoulos G. Co-culture engineering for microbial biosynthesis of 3-amino-benzoic acid in *Escherichia coli*. Biotechnology Journal, 2016, 11(7):149-150.

[37] Shin S Y, Han N S, Park Y C, et al. Production of resveratrol from p-coumaric acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing 4-coumarate: coenzyme A ligase and stilbene synthase genes. Enzyme & Microbial Technology, 2011, 48(1):48-53.

[38] Sun P, Liang J L, Kang L Z, et al. Increased resveratrol production in wines using engineered wine strains *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 and relaxed antibiotic or auxotrophic selection. Biotechnol Prog, 2014, 31(3):650-655.

[39] Wang S, Zhang S, Xiao A, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of various phenylpropanoid derivatives. Metabolic Engineering, 2015, 29(9):153-159.

[40] Santos C N, Koffas M, Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. Metabolic Engineering, 2011, 13(4):392-400.

[41] Shin S Y, Jung S M, Kim M D, et al. Production of resveratrol from tyrosine in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme & Microbial Technology, 2012, 51(4):211-216.